

Our Ref.: 249-201
K46-131992C/EK

U.S. PATENT APPLICATION

Inventor(s): Toyohide SHINKAWA
Kazuhisa UCHIDA
Motoo YAMASAKI
Emi HOSAKA
Kenya SHITARA

Invention: METHOD FOR PURIFYING ANTIBODY

***NIXON & VANDERHYE P.C.
ATTORNEYS AT LAW
1100 NORTH GLEBE ROAD
8TH FLOOR
ARLINGTON, VIRGINIA 22201-4714
(703) 816-4000
Facsimile (703) 816-4100***

SPECIFICATION

レンズマメレクチン（以下、LCA とも表記する）は、単糖である α -D-マンノース、 α -D-グルコースを認識することが知られている [ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry), 268, 7668, 1993]。また、LCA が、N-グリコシド結合糖鎖のアスパラギンに最も近い N-アセチルグルコサミン残基に L-フコースが α 1,6-結合した糖鎖構造を有する糖ペプチドに対して、強い結合性を示すことが知られている [カーボハイドレート・リサーチ (Carbohydrate Research), 40, 111, 1975、カーボハイドレート・リサーチ (Carbohydrate Research), 110, 283, 1982]。

しかしながら、これらは、糖鎖または糖鎖構造を含んだペプチドとレクチンとが結合することを示しているにすぎない。

抗体は、その Fc 領域（抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域）に結合した糖鎖構造を有しており、その糖鎖構造は Fc 領域に埋もれた形、すなわち抗体の立体構造において糖鎖構造が抗体の内側に向けた形で存在する [ネイチャー (Nature), 264, 415-420, 1976]。

ノセ (Nose) らは、セファロース (Sephadex) 担体に LCA を固定化したカラムを用いたが、マウス IgG2a を分離することができなかった。この結果より、彼らはハイブリドーマ細胞 (12-6 細胞) で生産させた通常のマウス IgG2a の糖鎖が Fc 領域に埋もれているためであると考察した。また、彼らは培地中に N 型糖鎖の成熟化を阻害する薬剤であるスワインソニンを添加させた後にハイブリドーマ 12-6 細胞を培養し、IgG2a タイプのモノクローナル抗体を生産させ、該培養物を LCA 固定化セファロースカラムに通塔したところ、モノクローナル抗体をカラムに結合させることができた。しかしながら、これはマウス IgG2a の Fc 領域に存在する糖鎖がスワインソニンの影響によりコンプレックス型糖鎖からハイブリッド型糖鎖に変換した結果、糖鎖が抗体の Fc 領域より外に露

出したためと考察されている [ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (The Journal of Immunology), 145, 910-914, 1990]。

以上のように糖鎖構造を人為的に変化させることにより抗体を精製した方法は知られているが、糖鎖構造を変化させることなく、糖鎖構造に着目して抗体を精製する方法はこれまでのところ知られていない。

ところで、抗体の Fc 領域に存在する糖鎖構造は、抗体の有する活性、具体的には抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC 活性とも表記する）、補体依存性細胞障害活性（以下、CDC 活性とも表記する）または生体内の安定性などに関与している。

糖鎖構造の非還元末端にガラクトース残基が付加されると、抗体の CDC 活性が上昇すること [モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunol.), 32, 1311, 1995 ; W098/58964]、抗体の Fc 領域のバイセクティング N-アセチルグルコサミン結合糖鎖含量を増加させることにより、抗体の ADCC 活性が上昇すること (W099/54342)、シアル酸の含量を増加させると体内での安定性が高まること [ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnology), 17, 1116, 1999] などが知られている。しかしながら、これらの活性に相関する糖鎖構造に着目し、ADCC 活性や CDC 活性などのエフェクター活性、または体内における安定性などの所望の性質を有する抗体の精製方法はこれまでのところ知られていない。

また、自己免疫疾患であるリウマチでは、患者の血中 IgG のガラクトース量が減少することが知られている [グライココンジュゲート・ジャーナル (Glycoconjugate Journal), 15, 929-934, 1998]。これまでのリウマチの診断方法としては、レクチンによるレクチンブロット法が用いられているが、生体内の抗体を変性させる工程などを含めて、操作が複雑である。

SUMMARY OF THE INVENTION

本発明の目的は、抗体を Fc 領域に結合する糖鎖構造の相違により精製し、所望の性質を有する抗体を高純度で得ることにある。また、このような手法により、生体内の抗体を精製し、各種疾患の診断に用いることが期待される。さらに、動物細胞等で生産した抗体から、所望の性質を有する抗体を精製することができる。特に本発明の方法により精製された ADCC 活性が高い抗体は、生体内の免疫系をより活性化できることが期待され、抗腫瘍効果をはじめとする、ヒトの各種疾患の治療上の有用性が期待される。

本発明は以下の (1) から (21) に関する。

(1) 抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いることを特徴とする、所望の性質を有する抗体を精製する方法。

(2) 糖鎖が、N-グリコシド結合糖鎖である、上記 (1) 記載の方法。

(3) N-グリコシド結合糖鎖が、バイセクティング N-アセチルグルコサミン、フコースまたはガラクトースが結合した糖鎖である、上記 (2) 記載の方法。

(4) 糖鎖に対し親和性を有する物質が、レクチンであることを特徴とする、上記 (1) 記載の方法。

(5) レクチンが、コンカナバリン A、小麦胚芽レクチン、レンズマメレクチンおよびインゲンマメレクチン E₄ からなる群から選ばれる少なくとも 1 種類のレクチンである、上記 (4) 記載の方法。

(6) 糖鎖に対し親和性を有する物質が、担体と結合していることを特徴とする、上記 (1) 記載の方法。

(7) 担体が、合成樹脂のポリマーであることを特徴とする、上記 (6) 記載の方法。

(8) 小麦胚芽レクチンまたはインゲンマメレクチン E_4 が固定化されたカラムを用いることを特徴とする、バイセクティング N-アセチルグルコサミンが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

(9) 小麦胚芽レクチンまたはインゲンマメレクチン E_4 が固定化されたカラムを用いることを特徴とする、抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

(10) レンズマメレクチンが固定化されたカラムを用いることを特徴とする、フコースが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

(11) レンズマメレクチンが固定化されたカラムを用いることを特徴とする、抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

(12) 疎水性クロマト用担体を用いることを特徴とする、ガラクトースが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

(13) 疎水性クロマト用担体を用いることを特徴とする、補体依存性細胞障害活性または抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

(14) 疎水性クロマト用担体に、フェニル基が結合している、上記 (13) 記載の方法。

(15) 上記 (1)～(14) のいずれか 1 項に記載の方法を組み合わせ、所望の性質を有する抗体を精製する方法。

(16) 抗体がヒト IgG である、上記 (1)～(15) のいずれか 1 項に記載の方法。

(17) ヒト IgG のサブクラスが IgG1 である、上記 (16) 記載の方法。

(18) 上記 (1)～(17) のいずれか 1 項に記載の方法で精製された抗体を有効成分とする医薬。

(19) 抗体がヒト IgG である、上記 (18) 記載の医薬。

(20) ヒト IgG のサブクラスが IgG1 である、上記 (19) 記載の医薬。

Figure 1 consists of 12 bar charts, labeled (a) through (l), each representing a different variable. Each chart compares the percentage of Clinton supporters (n=100) and Clinton opponents (n=100) for that variable. The y-axis for all charts ranges from 0 to 100 percent.

- (a) Age:** Clinton supporters are more likely to be 18-29 (35% vs 25%) and 30-49 (45% vs 35%). Clinton opponents are more likely to be 50-59 (25% vs 15%) and 60+ (25% vs 15%).
- (b) Sex:** Clinton supporters are more likely to be female (55% vs 45%). Clinton opponents are more likely to be male (55% vs 45%).
- (c) Education:** Clinton supporters are more likely to have a high school diploma or less (45% vs 35%) and a college degree (55% vs 45%). Clinton opponents are more likely to have a high school diploma or less (35% vs 25%) and a college degree (55% vs 45%).
- (d) Income:** Clinton supporters are more likely to have an income of \$10,000 or less (35% vs 25%) and \$10,001-\$20,000 (45% vs 35%). Clinton opponents are more likely to have an income of \$20,001-\$30,000 (25% vs 15%) and \$30,001-\$40,000 (25% vs 15%).
- (e) Employment:** Clinton supporters are more likely to be employed (65% vs 55%). Clinton opponents are more likely to be unemployed (35% vs 25%).
- (f) Home ownership:** Clinton supporters are more likely to own their home (65% vs 55%). Clinton opponents are more likely to not own their home (35% vs 25%).
- (g) Marital status:** Clinton supporters are more likely to be married (65% vs 55%). Clinton opponents are more likely to be single (35% vs 25%).
- (h) Political affiliation:** Clinton supporters are more likely to be Democrat (65% vs 55%). Clinton opponents are more likely to be Republican (35% vs 25%).
- (i) Party identification:** Clinton supporters are more likely to identify with the Democratic Party (65% vs 55%). Clinton opponents are more likely to identify with the Republican Party (35% vs 25%).
- (j) Trust in Clinton:** Clinton supporters are more likely to trust Clinton (65% vs 55%). Clinton opponents are more likely to not trust Clinton (35% vs 25%).
- (k) Trust in Bush:** Clinton supporters are more likely to not trust Bush (35% vs 25%). Clinton opponents are more likely to trust Bush (65% vs 55%).
- (l) Confidence in Clinton:** Clinton supporters are more likely to be confident in Clinton (65% vs 55%). Clinton opponents are more likely to not be confident in Clinton (35% vs 25%).

BRIEF EXPLANATION OF THE DRAWINGS

第 1 図は、抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンが固定化されたカラムによって分離した溶離図を示したものである。縦軸に UV280nm における吸光度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 2 図は、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、吸着画分の一部と、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の hIL-5R α との結合活性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は hIL-5R α との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。◇が非吸着画分、□が吸着画分の一部、△が分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体をそれぞれ示す。

第 3 図は、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、吸着画分の一部と、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の、hIL-5R 発現マウス T 細胞株 CTLL-2(h5R) に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。◇が非吸着画分、□が吸着画分の一部、△が分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体をそれぞれ示す。

第 4 図は、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、吸着画分の一部と、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。上図に非吸着画分の溶離図、中央図に吸着画分の一部、下図に分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中「-Fuc」はフコースを持たない糖鎖群、「+Fuc」はフコースが結合した糖鎖群を示す。

第 5 図は、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体と、バイセクティング GlcNAc を持つ糖鎖に結合するレクチンを用いたクロマトグラフィーにおいて、遅く溶出される画分から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。上図に分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体、下図に遅く溶出される画分の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中の「バイセクティング」はバイセクティング GlcNAc が結合した糖鎖群を示す。

第 6 図は、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体と、バイセクティング GlcNAc を持つ糖鎖に結合するレクチンを用いたクロマトグラフィーにおいて遅く溶出され、さらにフコースを持つ糖鎖に結合するレクチンを用いたクロマトグラフィーを行って分画した抗体のうち、吸着画分の一部から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。上図に分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体、下図に遅く溶出される画分の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中「- Fuc」はフコースを持たない糖鎖群、「バイセクティング」はバイセクティング GlcNAc が結合した糖鎖群を示す。

第 7 図は、早く溶出される画分、遅く溶出される画分から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。左図に早く溶出される画分、右図に遅く溶出される画分をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中斜線で示すピークはガラクトースを持たない糖鎖群、黒塗りで示すピークはガラクトースが結合した糖鎖群を示す。

第 8 図は、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、ならびに吸着画分の一部と、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の hIL-5R α との結合活性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は hIL-5R α

との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。◇が非吸着画分、□が吸着画分の一部、△が分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体をそれぞれ示す。

第 9 図は、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、ならびに吸着画分の一部と、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の、hIL-5R 発現マウス T 細胞株 CTLL-2(h5R)に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。◇が非吸着画分、□が吸着画分の一部、△が分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体をそれぞれ示す。

第 10 図は、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、吸着画分の一部と、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。上図に非吸着画分の溶離図、中央図に吸着画分の一部、下図に分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中「-Fuc」はフコースを持たない糖鎖群、「+Fuc」はフコースが結合した糖鎖群、「ハイマンノース」はハイマンノース型糖鎖群を示す。

第 11 図は、PHA-E₄ レクチンを用いたクロマトグラフィーにおいて、遅く溶出される画分、ならびに分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。上図に分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体、下図に遅く溶出される画分の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中の「バイセクティング」はバイセクティング GlcNAc が結合した糖鎖群を示す。

第 12 図は、PHA-E₄ レクチンを用いたクロマトグラフィーにおいて 18～30 分に溶出された画分を、さらに LCA レクチンを用いたクロマトグラフィーを行って分画した抗体のうち、吸着画分の一部から調製した PA 化糖鎖と、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析

して得た溶離図を示したものである。上図に分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体、下図に 2 種類のレクチンクロマトグラフィーで分離した画分の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中「-Fuc」はフコースを持たない糖鎖群、「バイセクティング」はバイセクティング GlcNAc が結合した糖鎖群を示す。

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

本発明において、抗体の補体依存性細胞障害活性または抗体依存性細胞障害活性が高いとは、精製後の抗体が、カラムに通塔する前の抗体や抗体組成物よりも、高い CDC 活性または ADCC 活性を有することを意味する。

抗体は、外来抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に生産される糖蛋白質であり、抗原と特異的に結合する活性を有する。

本発明で精製される抗体としては、動物に抗原を免疫することにより得られた抗血清、動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌するモノクローナル抗体、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などいかなるものでもよい。また、抗体の Fc 領域を融合させた融合タンパク質なども本発明では抗体として含まれる。

具体的には、マウスに免疫したのち脾臓細胞から得られるマウス抗体、マウス抗体とヒト抗体の遺伝子を任意に組込んだ宿主細胞を用いて生産されるヒト型キメラ抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81, 6851, 1984) またはヒト型相補性決定領域 (以下、CDR と表記する) 移植抗体 (Nature, 321, 522, 1986) などがあげられる。

抗体としては、好ましくはヒト IgG (イムノグロブリン) があげられる。さらに好ましくはサブクラスが IgG1 であるヒト IgG である。

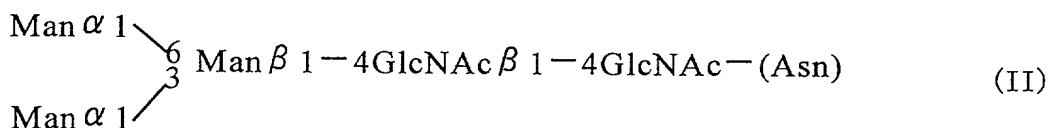


オリゴ糖は、単糖または単糖の置換誘導体が 2~10 個脱水結合して生じたものをいう。さらに多数の単糖が結合している糖質を多糖という。多糖は、構成糖の種類によって異なるが、ウロン酸やエステル硫酸を多く含む糖質を酸性多糖、中性糖のみのものを中性多糖という。多糖のうち、ムコ多糖とよばれる一群の多糖は、ほとんどが蛋白質と結合しており、プロテオグリカンという。

単糖とは、糖鎖の構成単位となるもので、加水分解によってそれ以上簡単な分子にならない基本的物質である。単糖は、カルボキシル基などの酸性側鎖を有する酸性糖、ヒドロキシル基がアミノ基で置換されたアミノ糖、それ以外の中性糖の3つに大別される。生体内に存在する単糖としては、酸性糖はN-アセチルノイラミン酸やN-グリコリルノイラミン酸（以下、Neu5Gcと略記する）などのシアル酸や、ウロン酸など、アミノ糖はN-アセチルグルコサミン（以下、GlcNAcと略記する）やN-アセチルガラクトサミンなど、中性糖はグルコース、マンノース、ガラクトース、フコースなどがあげられる。

抗体に結合する糖鎖としては、N-グリコシド結合糖鎖の3つの型のいずれも包含する。

N-グリコシド結合糖鎖は、以下に示す基本となる共通のコア構造を有する。



上記の構造において、アスパラギンと結合する糖鎖の末端を還元末端、反対側を非還元末端という。

本発明における糖鎖に親和性を示す物質としては、糖鎖と結合する性質を有する物質であればいかなるものでもよい。具体的には、蛋白質、抗体、低分子化合物などがあげられる。

糖鎖に親和性を示す蛋白質としては、マンノース結合タンパク質、繊維芽細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子などの糖結合蛋白質、レクチン、レクチン様物質などがあげられる。

レクチンとは、動植物をはじめとして微生物などあらゆる生物中に存在する、糖質に親和性を有する蛋白質の総称である。レクチンは、以下①～③のように定義されている。

- ① 糖質に結合し、細胞を凝集あるいは複合糖質を沈降させる。
- ② 非免疫学的な産物である。
- ③ 細胞や複合糖質との結合は、単糖またはオリゴ糖により阻止される。

複合糖質は、糖質を含む生体分子の総称で、糖蛋白質、プロテオグリカン、糖脂質を意味する。

レクチンとしては、ナタ豆（英名 Jack bean、学名 *Conavalia ensiformis*）由来のコンカナバリリン A（Concanavarin A: 以下 ConA と表記する）、小麦胚芽（英名 Wheat germ、学名 *Triticum vulgaris*）由来の小麦胚芽レクチン（以下 WGA と表記する）、レンズマメ（学名 *Lens culinaris*）由来の LCA、インゲンマメ（学名 *Phaseolus vulgaris*）由来のインゲンマメレクチン E₄（以下、PHA-E₄ と表記する）、ヒマ豆（英名 Caster been、学名 *Ricinus communis*）由来のヒマ豆レクチン（以下 RCA と表記する）などがあげられる。

ConA は、 α -D-マンノース、 α -D-グルコースを認識する。N-グリコシド結合糖鎖に強く結合するため、最も汎用されているレクチンである。

WGA は、ハイブリッド型糖鎖やシアル酸をもつ糖蛋白質との結合性が高く、バイセクティング GlcNAc の存在により強く結合する。

バイセクティング GlcNAc とは、上記の式 (I) において、 β 1,4 結合でマンノース残基に結合している GlcNAc を指す。

LCA は、 α -D-マンノース、 α -D-グルコースを認識する。N-グリコシド結合糖鎖のアスパラギンに最も近い GlcNAc 残基に L-フコースが α 1,6 結合した構造に強い結合性を示す。

PHA-E₄ は、2 本鎖、3 本鎖のアスパラギン結合型糖鎖に結合し、バイセクティング GlcNAc の存在により強く結合する。

RCA は、 β -D-ガラクトースを認識し、非還元末端に β -ガラクトースを有する O-グリコシド結合糖鎖または N-グリコシド結合糖鎖に結合する。特に、ガラクトース β 1-4GLCNAC 構造を有するコンプレックス型糖鎖には強い親和性を有する。

糖鎖に親和性を示す抗体としては、動物に糖鎖を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する糖鎖に対するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体から抗体遺伝子を取得し、該抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを宿主細胞へ導入し、該宿主細胞から生産することにより取得された、糖鎖に親和性を示す遺伝子組換え体抗体などがあげられる。

具体的には、マウスに免疫したのち脾臓細胞から得られるマウス抗体、マウス抗体とヒト抗体の遺伝子を任意に組込んだ宿主細胞を用いて生産されるヒト型キメラ抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体、およびそれらの抗体フラグメントである Fab、Fab'、F(ab)₂、一本鎖抗体 (Science, 242, 423, 1988)、2 量体化可変領域断片 (Nature Biotechnol., 15, 629, 1997)、ジスルフィド抗体断片 (ジスルフィド安定化可変領域断片) (Molecular Immunol., 32, 249, 1995)、CDR を含むペプチド (J. Biol. Chem., 271, 2966, 1996) などがあげられる。

さらに、ファージディスプレイなどの手法によって得られる、糖鎖に親和性を示すペプチド、蛋白質も包含される。

糖鎖に親和性を示す低分子化合物としては、セロトニン、フェニルホウ酸等があげられる。また、糖鎖に親和性を有する官能基を結合させた担体なども包含される。セロトニンは、シアル酸に親和性を有する低分子化合物である。

長い糖鎖を有している抗体は、水酸基数が多くなるために疎水性が低くなり、短い糖鎖を有している抗体は、水酸基数が少なくなるために疎水性が高くなる。

糖鎖に親和性を有する官能基としては、フェニル基、ブチル基、オクチル基など疎水性官能基があげられる。これらの官能基を結合させた担体を用いることにより、上記の式 (I) で示された非還元末端側の糖の付加が少ない糖鎖構造を有する抗体を精製し、取得することができる。

糖鎖に対し親和性を有する物質を、樹脂、膜等の担体に直接または間接的に結合させた器材を用いて、クロマトグラフィー等を行うことにより所望の性質を有する抗体を精製することができる。

担体としては、合成樹脂ポリマー、好ましくはアクリル系合成樹脂ポリマーまたはビニル系合成樹脂ポリマー、より好ましくはアクリル酸エステルがあげられる。

本発明における所望の性質としては、CDC 活性、ADCC 活性など抗体のエフェクター活性または体内における安定性などがあげられる。

CDC 活性とは、抗原に結合した抗体に補体が結合して膜障害性蛋白複合体を形成し、微生物などの膜に穴をあけたり、マクロファージや好中球に捕食されるように働く活性を意味する。ADCC 活性とは、腫瘍細胞等に結合した抗体が、抗体の Fc 領域とキラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在する Fc レセプターの結合を介してエフェクター細胞を活性化し、腫瘍細胞等を障害する活性を意味する。

また、所望の性質には、抗体の有する糖鎖構造の均一性なども含まれる。

以上にあげた所望の性質は、抗体の有する糖鎖構造に起因する。抗体の Fc 領域に結合する糖鎖構造が、還元末端の GlcNAc へ $\alpha 1,6$ 結合するフコースを持たない糖鎖構造、バイセクティング GlcNAc を有する糖鎖構造である割合が高いほど抗体の ADCC 活性が高い。また、抗体の Fc 領域に結合する糖鎖構造が、ガラクトースを有する糖鎖構造である割合が高いほど、抗体の CDC 活性および ADCC 活性が高い。シアル酸の含量を増加させた糖鎖構造を有する割合が高いほ

ど、抗体の体内での安定性がよい。また、シアル酸うち、Neu5Gc を持たない糖鎖構造を有する割合が高いほど、抗体の免疫原性が低い。

したがって、これらの糖鎖構造を特異的に認識する物質を用いて精製を行うことにより、所望の性質を有する抗体を精製することができる。

また、本発明の精製方法を組み合わせることによって、所望の性質を有する抗体をさらに精製することができる。

本発明の精製方法では、血清などの体液、抗体を生産する細胞を培養した培養液などから抗体を精製することができる。該培養液はあらかじめ細胞を除去して得られる溶液が好ましく、他の糖蛋白質が共存しない溶液がより好ましい。具体的には、従来の抗体の精製方法、例えばプロテイン A などによる精製で予め粗精製された溶液などがあげられる。さらに、抗体を生産する細胞を培養した培養液としては、無血清または無蛋白質の培地で培養した培養液が好ましい。

以下、本発明の精製、評価および使用方法について具体的に例示する。

1. 抗体の精製

(1) レクチンクロマトグラフィーによる精製

レクチンクロマトグラフィーは、レクチンが糖鎖と特異的に結合する性質を利用した、アフィニティークロマトグラフィーである。

所望の性質を有する抗体を精製するために用いるレクチンの種類としては、抗体の糖鎖構造により選択することができる。

所望の性質が CDC 活性の場合には、ガラクトースに親和性を有するレクチンを用いることができる。ガラクトースに親和性を有するレクチンとしては、RCA があげられ、好ましくは RCA120 があげられる。

所望の性質が ADCC 活性の場合には、フコースまたはバイセクティング GlcNAc に親和性を有するレクチンを用いることができる。フコースに親和性を

有するレクチンとしては、LCA があげられ、好ましくは LA-LCA4（ホーネンコーポレーション社製）があげられる。バイセクティング GlcNAc に親和性を有するレクチンとしては、WGA、PHA-E₄ などがあげられ、好ましくは LA-WCA4、LA-PHA-E₄（ともにホーネンコーポレーション社製）があげられる。

所望の性質を有する抗体の糖質構造が明らかな場合には、上述したレクチンの特異性を参考にしてレクチンを選択する。

所望の性質を有する抗体の糖質構造が不明な場合は、ビオチン、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase) 等で標識されたレクチンを用いて、ドットブロット法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 204(1), 198, 1992] やウエスタンブロット法 [法医学の実際と研究, 37, 155, 1994] 等を行うことにより、結合性のあるレクチンを選択することができる。

1 分子に複数本の糖鎖が存在する糖蛋白質では、レクチンとの結合がより強固になり、カラムから溶出しにくい場合がある。その場合、溶出液の糖濃度を高くすることにより溶出されやすくなるが、糖蛋白質との結合の弱い別のレクチンを選択する方が好ましい。

レクチンクロマトグラフィーに用いるカラムとしては、具体的には、HiTrap ConA、HiTrap Lentil Lectin (LCA)、HiTrap Wheat Germ Lectin (WGA)、(以上、Pharmacia 社製) などがあげられる。また、微生物、植物、動物等の生体試料から単離したレクチンを、担体に固定化したカラムを用いてもよい。担体としては、アガロース、アクリル系合成樹脂のポリマー等があげられ、好ましくはアクリル酸エステルポリマーがあげられる。高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLC と表記する）システムを使用する場合は、一般に市販されてい

る HPLC システムであればいかなるものでもよい。例えば、LC-6A (Shimadzu 社製) などがあげられる。

HPLC システムを使用した精製方法の一例を示す。溶離液は、10～100mmol/l トリス-硫酸緩衝液、10～100mmol/l 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液などを用いる。pH は 7～8 程度の間が好ましい。まず、10～100mmol/l トリス-硫酸緩衝液または 10～100mmol/l 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液などの初期緩衝液でカラムを十分に平衡化する。HPLC システムにより試料を通塔し、溶出糖を含む 10～100mmol/l トリス-硫酸緩衝液または 10～100mmol/l 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を用いて溶出させる。溶出糖はレクチンによって異なる。例えば、ConA カラムの場合は、溶出糖として 0.02～0.5mol/l メチル α -D-グルコシドや 0.02～0.5mol/l メチル α -D-マンノシドを用いる。溶出はステップワイズ法またはグラジエント法により溶出する。蛋白質は、例えば紫外線吸収、電気泳動などの方法により検出することができる。

(2) 疎水性クロマトグラフィーによる精製

疎水性クロマトグラフィーは、蛋白質の疎水性の違いにより分離する手法である。一般的には、目的蛋白質と夾雑蛋白質との疎水性の違いを利用して、目的蛋白質を分離する場合に用いられている。

同一蛋白質の疎水性クロマトグラフィーを行う場合、溶出時間の違いによって蛋白質の有する糖鎖構造の違いや、二量体含量の相違が見られる場合がある。これは、蛋白質の立体構造が変化することにより、疎水性に差異が生じるためである。

疎水性クロマトグラフィーに使用するカラムとしては、一般には市販されている疎水性クロマトグラフィーのカラムであればいかなるものでもよい。例え

ば、HiTrap 16/10 Phenyl (Pharmacia 社製)、TSK-gel Phenyl-5PW (TOSOH 社製) などがあげられる。

HPLC システムを使用する場合は、一般に市販されている HPLC システムであればいかなるものでもよい。例えば、LC-6A (Shimadzu 社製) などがあげられる。

HPLC システムを使用した精製方法の一例を示す。溶離液には、10～100mmol/l クエン酸-グリシン緩衝液または 10～100mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液などを用いる。pH は 5～8 程度の間、好ましくは pH7 前後とする。まず、硫酸アンモニウム（以下、硫安と表記する）0.5～1mol/l 程度を含む 10～100mmol/l クエン酸-グリシン緩衝液または 10～100mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液などの初期溶離液で充分カラムを平衡化する。HPLC システムにより試料を通塔し、10～100mmol/l クエン酸-グリシン緩衝液または 10～100mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液などの溶出緩衝液で溶出させる。溶出はステップワイズ法またはグラジエント法により溶出する。蛋白質は、例えば紫外線吸収、電気泳動などの方法により検出することができる。

2. 抗体の評価方法

上記 1 の方法により得られた抗体の活性測定、また抗体に結合する糖鎖の分析については下記の方法を用いることができる。

(1) 抗体の活性評価

上記 1 で精製された抗体と抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性は ELISA 法及び蛍光抗体法 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373, 1993] 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、CDC 活性、ADCC 活性等を測定し、

評価することができる [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373, 1993]。更にヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

(2) 抗体の糖鎖の分析方法

抗体の糖鎖構造の解析方法としては、2次元糖鎖マップ法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73, 1988、生物化学実験法 23-糖蛋白質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989)] があげられる。2次元糖鎖マップ法は、例えば、X 軸には逆相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y 軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖の結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PA と略記する) による糖鎖の蛍光標識 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. of Biochem.), 95, 197, 1984] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰の PA 化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。さらに、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73, 1988] 上にプロットし、糖鎖構造を推定することができる。

さらに各糖鎖の MALDI-TOF-MS などの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される糖鎖構造を確認することができる。

3. 抗体の使用法

(1) 本発明の精製方法で取得された抗体を有効成分として含有する医薬

上記 1 の方法で精製された抗体を、上記 2 の評価方法により抗体の性質を確認する。

LCA は GlcNAc 残基に L-フコースが $\alpha 1,6$ 結合した構造に親和性を有する。そこで、LCA を用いた抗体の精製により、抗体の Fc 領域に結合する糖鎖構造が、還元末端側の GlcNAc に $\alpha 1,6$ 結合するフコースを有するか、または有しない抗体を分離し、精製することができる。

また、WGA および PHA-E₄ はバイセクティング GlcNAc に対し親和性を有する。そこで、WGA または PHA-E₄ を用いた抗体の精製により、抗体の Fc 領域に結合する糖鎖構造が、非還元末端側にバイセクティング GlcNAc を有するか、または有しない抗体を分離し、精製することができる。

LCA による精製で得られる還元末端側の GlcNAc にフコースが結合していない糖鎖構造を有する抗体、WGA または PHA-E₄ による精製で得られる非還元末端側にバイセクティング GlcNAc を持つ糖鎖構造を有する抗体は、ADCC 活性が高い。

このような性質を有する抗体は、癌、アレルギー、循環器疾患、またはウイルスあるいは細胞感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

通常、抗がん剤は癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、高い ADCC 活性を有していれば癌細胞を傷害することにより癌を治療することができるので、通常、抗がん剤よりも有用である。

アレルギー反応は、免疫細胞によるメディエータ分子の放出により惹起されるため、高い ADCC 活性を有する抗体を用いて免疫細胞を除去することにより、アレルギー反応をおさえることができる。

循環器疾患としては、動脈硬化などがあげられる。動脈硬化の治療方法の一つにバルーンカテーテルがあるが、これにより動脈細胞が増殖し、再狭窄が発生することがある。高い ADCC 活性を有する抗体を用いて動脈細胞の増殖を抑制することにより、循環器疾患を予防および治療することができる。

高い ADCC 活性を有する抗体を用いてウイルスまたは細菌に感染した細胞の増殖を抑制することにより、ウイルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療することができる。

上記 1(1)の LCA を用いて精製される抗体のうち、還元末端の GlcNAc へ $\alpha 1,6$ 結合するフコースを有する糖鎖構造を有する抗体は、上述した抗体よりも ADCC 活性が低くなる。このように、ADCC 活性が抑制された抗体は、自己免疫疾患において亢進された免疫反応を押さえるという観点から、自己免疫疾患の予防および治療において有用である。

上記 1(2)の疎水クロマトグラフィーによって精製される抗体のうち、ガラクトースを有する糖鎖構造を多くを有する抗体は、CDC 活性および ADCC 活性が高い。したがって、このような性質を有する抗体は、癌、アレルギー、循環器疾患、またはウイルスあるいは細胞感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

上記 1(2)の疎水クロマトグラフィーによって精製される抗体のうち、ガラクトースを有する糖鎖構造が少ない抗体は、精製する前の抗体よりも CDC 活性および ADCC 活性が低くなる。このように、CDC 活性、ADCC 活性が抑制された抗体は、自己免疫疾患において亢進された免疫反応を押さえるという観点から、自己免疫疾患の予防および治療において有用である。

また、これらの糖鎖構造、ならびに糖鎖構造に起因する抗体の性質は、混合されていてもよい。そのような抗体を精製する手法としては、具体的には、糖鎖に親和性を示す物質を固定化したカラムを組み合わせたリ、糖鎖への結合特

異性が異なる物質を同一カラム内に混合して作製したカラムを用いる方法があげられる。

上記の精製された抗体は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与をあげることができ、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤などがあげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などがあげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトールなどの賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。

Variable	Mean	SD	Min	Max
Age	38.5	12.5	25	65
Gender	0.5	0.5	0	1
Marital status	0.5	0.5	0	1
Education	12.5	2.5	9	16
Income	15.5	5.5	10	25
Health status	0.5	0.5	0	1
Smoking status	0.5	0.5	0	1
Alcohol consumption	0.5	0.5	0	1
Exercise frequency	0.5	0.5	0	1
Stress level	0.5	0.5	0	1
Sleep quality	0.5	0.5	0	1
Work satisfaction	0.5	0.5	0	1
Life satisfaction	0.5	0.5	0	1
Overall health	0.5	0.5	0	1
Physical activity	0.5	0.5	0	1
Mental health	0.5	0.5	0	1
Social support	0.5	0.5	0	1
Work-life balance	0.5	0.5	0	1
Financial stability	0.5	0.5	0	1
Family harmony	0.5	0.5	0	1
Personal growth	0.5	0.5	0	1
Community involvement	0.5	0.5	0	1
Environmental awareness	0.5	0.5	0	1
Cultural appreciation	0.5	0.5	0	1
Artistic expression	0.5	0.5	0	1
Volunteer work	0.5	0.5	0	1
Charitable contributions	0.5	0.5	0	1
Philanthropic activities	0.5	0.5	0	1
Leadership roles	0.5	0.5	0	1
Networking opportunities	0.5	0.5	0	1
Professional development	0.5	0.5	0	1
Continuous learning	0.5	0.5	0	1
Adaptability to change	0.5	0.5	0	1
Resilience to stress	0.5	0.5	0	1
Emotional regulation	0.5	0.5	0	1
Conflict resolution skills	0.5	0.5	0	1
Effective communication	0.5	0.5	0	1
Team collaboration	0.5	0.5	0	1
Problem-solving abilities	0.5	0.5	0	1
Decision-making skills	0.5	0.5	0	1
Time management	0.5	0.5	0	1
Organization skills	0.5	0.5	0	1
Attention to detail	0.5	0.5	0	1
Initiative and proactivity	0.5	0.5	0	1
Accountability and responsibility	0.5	0.5	0	1
Empathy and compassion	0.5	0.5	0	1
Open-mindedness	0.5	0.5	0	1
Critical thinking	0.5	0.5	0	1
Logical reasoning	0.5	0.5	0	1
Strategic planning	0.5	0.5	0	1
Goal setting and achievement	0.5	0.5	0	1
Perseverance and determination	0.5	0.5	0	1
Self-motivation	0.5	0.5	0	1
Positive attitude	0.5	0.5	0	1
Optimism	0.5	0.5	0	1
Gratitude	0.5	0.5	0	1
Forgiveness	0.5	0.5	0	1
Humility	0.5	0.5	0	1
Patience	0.5	0.5	0	1
Kindness	0.5	0.5	0	1
Generosity	0.5	0.5	0	1
Respect for others	0.5	0.5	0	1
Integrity and honesty	0.5	0.5	0	1
Trustworthiness	0.5	0.5	0	1
Reliability	0.5	0.5	0	1
Consistency in actions	0.5	0.5	0	1
Adherence to values	0.5	0.5	0	1
Authenticity in relationships	0.5	0.5	0	1
Transparency in communication	0.5	0.5	0	1
Active listening	0.5	0.5	0	1
Empathetic responses	0.5	0.5	0	1
Supportive interactions	0.5	0.5	0	1
Constructive feedback	0.5	0.5	0	1
Collaborative problem-solving	0.5	0.5	0	1
Shared responsibility	0.5	0.5	0	1
Team cohesion	0.5	0.5	0	1
Positive team dynamics	0.5	0.5	0	1
Effective leadership	0.5	0.5	0	1
Inspiring others	0.5	0.5	0	1
Mentoring and coaching	0.5	0.5	0	1
Empowering team members	0.5	0.5	0	1
Clear communication of goals	0.5	0.5	0	1
Accountability to the team	0.5	0.5	0	1
Recognition of team achievements	0.5	0.5	0	1
Flexibility in team structure</				


Write about it!
Write about it!
Write about it! **Work smart!** **Work smart!** **Work smart!** **Work smart!**

カラムを組み合わせることで、リウマチ等の疾患などを、より特異的に、かつ簡便に診断することができる。

具体的には、自己免疫疾患であるリウマチの診断があげられる。

以上述べたように、本発明により、所望の性質を有する抗体を精製することができる。また、本発明の精製方法により得られた抗体を有効成分とする医薬は、所望の活性を有するため、ヒトの各種疾患の診断に有用である。また、生体試料から抗体を精製する方法と同様の方法を用いることにより、各種疾患を診断することができる。

以下に、本発明の実施例を示すが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

実施例 1：フコース結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画

フコースを有する糖鎖に結合するレクチンを用いて、抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を精製した。

まず、W097/10354 記載の方法に従って作製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体発現ベクターを、ラットミエローマ YB2/0 細胞へ導入して抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を生産する細胞を取得した。該細胞を培地中に培養した後、培養培地より抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を W097/10354 記載の方法に従って精製した。

次に、上記で精製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を含む溶液を、レクチンカラム (LA-LCA、4.6 \times 150mm、ホーネンコーポレーション社製) に通塔した。HPLC システムとしては Shimadzu 社製 LC-6A を用いて、流速 0.5ml/分、カラム温度は室温でカラムへ溶液を通塔した。カラムを 50mM トリス-硫酸緩衝液 (pH7.3) で平衡化し、精製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を注入後、50mM トリス-硫酸緩衝液 (pH7.3) 中 0M から 0.2M の α -メチルマンノシド (ナカライテ

スク社製) によるリニアグラジエント (60 分間) にて溶出した。抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を非吸着画分と吸着画分とに分画した (第 1 図)。

(2) 結合活性測定 (ELISA 法)

第 1 図中に示した非吸着画分、吸着画分の一部をとり、hIL-5R α に対する結合活性を、ELISA 法により測定した。W097/10354 に記載の抗 hIL-5R α マウス抗体 KM1257 を PBS で 10 μ g/ml の濃度に希釈した溶液の 50 μ l を 96 ウェルの ELISA 用のプレート (Greiner 社製) の各ウェルにそれぞれ分注し、4°C で 20 時間反応させた。反応後、1%BSA-PBS を 100 μ l/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、W097/10354 に記載の可溶性 hIL-5R α を 1%BSA-PBS で 0.5 μ g/ml の濃度に希釈した溶液を 50 μ l/ウェルで加え、4°C で 20 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型 CDR 移植抗体の各種希釈溶液を 50 μ l/ウェルで加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (H&L) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、50 μ l/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 (2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウムの 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素を 1 μ l/ml で添加した溶液) を 50 μ l/ウェルで加えて発色させ、415nm での吸光度 (OD415) を測定した。

測定の結果、非吸着画分と吸着画分の一部は、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体と同様の結合活性を示した (第 2 図)。

(3) *in vitro* 細胞障害活性 (ADCC 活性)

非吸着画分と吸着画分の一部の ADCC 活性を測定した。まず、標的細胞溶液の調製を行った。W097/10354 に記載の hIL-5R α 鎖及び β 鎖を発現しているマウス T 細胞株 CTLL-2(h5R) を RPMI1640-FBS(10) 培地で培養し、 1×10^6 細胞/0.5ml となる様に調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を 3.7MBq 当量加えて 37°C で 1.5 時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4°C で 30 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を 5ml 加え、 2×10^5 細胞/ml に調製し、標的細胞溶液とした。

次に、エフェクター細胞溶液の調製を行った。健常人静脈血 50ml を採取し、ヘパリンナトリウム (武田薬品社製) 0.5ml を加え穏やかに混ぜた。これを Polymorphprep (Nycomed Pharma AS 社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、培地を用いて 9×10^6 細胞/ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

96 ウェル U 字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに、調製した標的細胞溶液の $50 \mu\text{l}$ (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで調製したエフェクター細胞溶液を $100 \mu\text{l}$ (9×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 90:1 となる) 添加した。更に、各種抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を各最終濃度 0.001~0.1 $\mu\text{g/ml}$ となる様に加え、37°C で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに 1 規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC 活性は下式により求めた。

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100$$

その結果を第 3 図に示した。非吸着画分は分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体より ADCC 活性が高く、吸着画分の一部は分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体よりも低い ADCC 活性を示した。

(4) 糖鎖分析

非吸着画分および吸着画分の一部をヒドラジン分解により糖鎖を蛋白質から切断した [メソッド・イン・エンザイモロジー (Method in Enzymology), 83, 263, 1982]。ヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えて N-アセチル化を行った。凍結乾燥後、PA による蛍光標識を行った [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. of Biochem.), 95, 197, 1984]。蛍光標識した糖鎖群 (PA 化糖鎖群) を、Surperdex Peptide HR 10/30 カラム (Pharmacia 社製) を用いて過剰な試薬と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製 PA 化糖鎖群とした。次に、CLC-ODS カラム (Shimadzu 社製) を用いて、精製 PA 化糖鎖群の逆相 HPLC 分析を行った (第 4 図)。PA 化糖鎖群は、39 分から 75 分の範囲に溶出した。ピーク面積から計算すると、非吸着画分はフコースのない糖鎖が 100%、吸着画分の一部はフコースのない糖鎖が 18%であった。分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体ではフコースのない糖鎖が 37%であった。このことから、フコースを有する糖鎖に結合するレクチンカラムを用いて、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体よりもフコースのない糖鎖の含量が多い抗体とフコースのない糖鎖の含量が少ない抗体とを分離・精製することができた。

実施例 2：バイセクティング GlcNAc 結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画

バイセクティング GlcNAc を有する糖鎖に結合するレクチンを用いて、抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を精製した。

まず、W097/10354 記載の方法に従って作製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体発現ベクターを、ラットミエローマ YB2/0 細胞へ導入して抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を生産する細胞を取得した。該細胞を培地中に培養した後、培養培地より抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を W097/10354 記載の方法に従って精製した。

次に、上記で精製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を含む溶液をレクチンカラム (LA-WGA、4.6 \times 150mm、ホーネンコーポレーション社製) に通塔した。HPLC システムとしては Shimadzu 社製 LC-6A を用いて、流速 0.5ml/分、カラム温度は室温でカラムへ溶液を通塔した。50mM トリス-硫酸緩衝液 (pH7.3) で平衡化し、精製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を注入後、50mM トリス-硫酸緩衝液 (pH7.3) 中 0M から 0.2M への GlcNAc (純正化学社製) によるリニアグラジエント (60 分間) にて溶出した。抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を、2~5 分間に溶出された画分と 8~12 分間に溶出された画分に分離した。

(2) 糖鎖分析

早く溶出された画分および遅く溶出された画分の抗体の糖鎖分析を、実施例 1 の (4) 項に示す方法で行った。PA 化糖鎖群は、20 分から 50 分の範囲に溶出した。その結果、遅く溶出された画分の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体は、精製・分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体と比較して、バイセクティング GlcNAc を持つ糖鎖の含量が、6%から 12%に増加した (第 5 図)。

実施例 3：フコースを有する糖鎖が少なく、バイセクティング GlcNAc 結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画

実施例 2 で得られた、バイセクティング GlcNAc 結合糖鎖を多く含む抗体組成物を、実施例 1 の(1)項と同様の方法を用いて、非吸着画分と吸着画分の一部に分離した。

(2) 糖鎖分析

非吸着画分と、吸着画分の一部の糖鎖分析を、実施例 1 の(4)項に示す方法で行った。PA 化糖鎖群は、18 分から 45 分の範囲に溶出した。その結果、吸着画分の一部は、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体と比較して、フコースのない糖鎖の含量が 29%から 15%に減少し、バイセクティング GlcNAc 結合糖鎖が 5%から 18%に増加した (第 6 図)。

実施例 4：ガラクトース結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) 疎水性クロマトグラフィーによる抗体の分画

疎水性クロマトグラフィーを用いて、抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を精製した。

まず、W097/10354 記載の方法に従って作製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体発現ベクターを、ラットミエローマ YB2/0 細胞へ導入して抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を生産する細胞を取得した。該細胞を培地中に培養した後、培養培地より抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を W097/10354 記載の方法に従って精製した。

次に、上記で精製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を含む溶液を、疎水性カラムである Phenyl-5PW (東ソー社製)に通塔した。HPLC システムは Shimadzu 社製 LC-6A を使い、流速は 1ml/分、カラム温度は室温で行った。1M 硫酸を含む 20mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) で平衡化し、精製された抗 hIL-5R α

CDR 移植抗体を注入後、20mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) へのリニアグラジェント (60 分間) にて溶出した。抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を、早く (4~6 分間) 溶出された画分と遅く (20~25 分間) 溶出された画分とに分離した。

(2) 糖鎖分析

早く溶出された画分および遅く溶出された画分の糖鎖解析を、実施例 1 の (4) 項に示す方法で行った。PA 化糖鎖群は、33 分から 70 分の範囲に溶出した。その結果、早く溶出された画分はガラクトース結合糖鎖の含量が 53%、遅く溶出された画分は、ガラクトース結合糖鎖の含量 44%であった (第 7 図)。

実施例 5 : フコース結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画

フコースを有する糖鎖に結合するレクチンを用いて、抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を精製した。

まず、W097/10354 記載の方法に従って作製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体発現ベクターを、マウスミエローマ NS0 細胞へ導入して抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を生産する細胞を取得した。該細胞を培地中に培養した後、培養培地より抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を W097/10354 記載の方法に従って精製した。

精製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を含む溶液を、実施例 1 の (1) 項と同様の方法を用いて、抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を非吸着画分と吸着画分とに分画した。

(2) 結合活性測定 (ELISA 法)

非吸着画分、吸着画分の一部をとり、hIL-5R α に対する結合活性を、実施例 1 の(2)項と同様の方法で測定した。非吸着画分と吸着画分の一部は、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体と同様の結合活性を示した (第 8 図)。

(3) *in vitro* 細胞障害活性 (ADCC 活性)

非吸着画分と吸着画分の一部の ADCC 活性を、実施例 1 の(3)項と同様の方法で測定した。非吸着画分は分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体より ADCC 活性が高く、吸着画分の一部は分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体よりも低い ADCC 活性を示した (第 9 図)。

(4) 糖鎖分析

非吸着画分、吸着画分の一部の糖鎖分析を、実施例 1 の(4)項と同様の方法で行った (第 10 図)。PA 化糖鎖群は、15 分から 55 分の範囲に溶出した。ピーク面積から計算すると、非吸着画分はハイマンノース型糖鎖が 84%、フコースのないコンプレックス型糖鎖が 16%であった。吸着画分の一部は、ハイマンノース型糖鎖が 5%、フコースのないコンプレックス型糖鎖が 7%であった。分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体では、ハイマンノース型糖鎖が 7%、フコースのないコンプレックス型糖鎖が 8%であった。このことから、フコースを有する糖鎖に結合するレクチンカラムを用いることによって、ハイマンノース型、コンプレックス型糖鎖にかかわらず、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体よりもフコースのない糖鎖の含量が多い抗体と、フコースのない糖鎖の含量が少ない抗体とを分離・精製することができた。

実施例 6 : バイセクティング GlcNAc 結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画

バイセクティング GlcNAc を有する糖鎖に結合するレクチンを用いて、抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を精製した。

まず、W097/10354 記載の方法に従って作製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体発現ベクターを、マウスミエローマ NS0 細胞へ導入して抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を生産する細胞を取得した。該細胞を培地中に培養した後、培養培地より抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を W097/10354 記載の方法に従って精製した。

次に、上記で精製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を含む溶液をレクチンカラム (LA-PHA-E₄、4.6×150mm、ホーネンコーポレーション社製) に通塔した。HPLC システムとしては Shimadzu 社製 LC-6A を用いて、流速 0.5ml/分、カラム温度は室温でカラムへ溶液を通塔した。50mM トリス-硫酸緩衝液 (pH8.0) で平衡化し、精製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を注入後、50mM トリス-硫酸緩衝液 (pH8.0) 中 0M から 0.1M への K₂B₄O₇ (ナカライ社製) によるリニアグラジエント (60 分間) にて溶出した。抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を、早く (5~8 分) 溶出された画分と遅く (18~30 分) 溶出された画分に分離した。

(2) 糖鎖分析

遅く溶出された画分と、分離前の抗体の糖鎖分析を、実施例 1 の (4) 項に示す方法で行った。PA 化糖鎖群は、26 分から 55 分の範囲に溶出した。その結果、遅く溶出された画分の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体は、精製・分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体と比較して、バイセクティング GlcNAc を持つ糖鎖の含量が、4% から 21% に増加した (第 11 図)。

実施例 7：フコースを有する糖鎖が少なく、バイセクティング GlcNAc 結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画

実施例 6(1)で得られた、バイセクティング GlcNAc 結合糖鎖を多く含む抗体を、実施例 1 の(1)項と同様の方法を用いて、非吸着画分と吸着画分の一部に分離した。

(2) 糖鎖分析

非吸着画分と、吸着画分の一部の糖鎖分析を、実施例 1 の(4)項に示す方法で行った。PA 化糖鎖群は、25 分から 55 分の範囲に溶出した。その結果、吸着画分の一部は、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体と比較して、フコースのない糖鎖の含量が 27%から 10%に減少し、かつバイセクティング GlcNAc 結合糖鎖が 4%から 31%に増加した (第 12 図)。

While the invention has been described in detail and with reference to specific embodiments thereof, it will be apparent to one skill in the art that various changes and modifications can be made therein without departing from the spirit and scope thereof. All references cited herein are incorporated in their entirety.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. 抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いることを特徴とする、所望の性質を有する抗体を精製する方法。
2. 糖鎖が、N-グリコシド結合糖鎖である、請求の範囲 1 記載の方法。
3. N-グリコシド結合糖鎖が、バイセクティング N-アセチルグルコサミン、フコースまたはガラクトースが結合した糖鎖である、請求の範囲 2 記載の方法。
4. 糖鎖に対し親和性を有する物質が、レクチンであることを特徴とする、請求の範囲 1 記載の方法。
5. レクチンが、コンカナバリン A、小麦胚芽レクチン、レンズマメレクチンおよびインゲンマメレクチン E₄ からなる群から選ばれる少なくとも 1 種類のレクチンである、請求の範囲 4 記載の方法。
6. 糖鎖に対し親和性を有する物質が、担体と結合していることを特徴とする、請求の範囲 1 記載の方法。
7. 担体が、合成樹脂のポリマーであることを特徴とする、請求の範囲 6 記載の方法。

8. 小麦胚芽レクチンまたはインゲンマメレクチン E_4 が固定化されたカラムを用いることを特徴とする、バイセクティング N-アセチルグルコサミンが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

9. 小麦胚芽レクチンまたはインゲンマメレクチン E_4 が固定化されたカラムを用いることを特徴とする、抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

10. レンズマメレクチンが固定化されたカラムを用いることを特徴とする、フコースが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

11. レンズマメレクチンが固定化されたカラムを用いることを特徴とする、抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

12. 疎水性クロマト用担体を用いることを特徴とする、ガラクトースが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

13. 疎水性クロマト用担体を用いることを特徴とする、補体依存性細胞障害活性または抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

14. 疎水性クロマト用担体に、フェニル基が結合している、請求の範囲 13 記載の方法。

15. 請求の範囲 1～14 のいずれか 1 項に記載の方法を組み合わせ、所望の性質を有する抗体を精製する方法。

16. 抗体がヒト IgG である、請求の範囲 1～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

17. ヒト IgG のサブクラスが IgG1 である、請求の範囲 16 記載の方法。

18. 請求の範囲 1～17 のいずれか 1 項に記載の方法で精製された抗体を有効成分とする医薬。

19. 抗体がヒト IgG である、請求の範囲 18 記載の医薬。

20. ヒト IgG のサブクラスが IgG1 である、請求の範囲 19 記載の医薬。

21. 抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いることを特徴とする、各種疾患の診断方法。

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

本発明は、抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いて所望の性質を有する抗体、該方法で精製された抗体を有効成分とする医薬、および抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いる各種疾患の診断または予防方法に関する。

0990154-1044
T0400T 45F0660